

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Cátiusca Reali

**A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DE DOADORES DE CÓRNEA EM CASOS DE
INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE**

Porto Alegre

2019

Catiusca Reali

**A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DE DOADORES DE CÓRNEA EM CASOS DE
INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Reali, Catusca
A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DE DOADORES DE CÓRNEA EM
CASOS DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE / Catusca Reali. --
2019.
48 f.
Orientadora: Mercedes Passos Geimba.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Microbiologia Clínica,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Microbiota ocular. 2. Transplante de córneas. 3.
Meios de preservação. 4. Resistência a
antimicrobianos. I. Geimba, Mercedes Passos, orient.
II. Título.

RESUMO

O transplante de córneas proporciona a recuperação da visão a um custo muito baixo. Atualmente, é o principal tratamento para pessoas que apresentam distúrbios de curvatura ou transparência da córnea. No entanto, no Brasil, não há um protocolo unificado sobre os meios de preservação, tempo de armazenamento e antibióticos utilizados. A preocupação com a eficiência dos meios de preservação, na descontaminação das córneas, é de que agentes patogênicos sejam transferidos aos receptores de transplantes, causando infecções oculares após o transplante. Este artigo realizou um levantamento de referências teóricas, já publicadas e disponibilizados por plataformas digitais governamentais, assim como periódicos científicos buscados pelo portal de periódicos da Capes, e PubMed. O levantamento mostrou que estudos baseados em cultivo de microrganismos, trazem *Staphylococcus* cagulase negativa em 30 a 100% das amostras isoladas de conjuntivas. Em menor quantidade estão *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Bactérias Gram-negativas aparecem em número muito inferior, representadas pelos gêneros *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* e *Acinetobacter*. Já os resultados baseados em técnicas independentes de cultivo trazem *Pseudomonas* como a principal colonizadora da conjuntiva, contrariando os resultados obtidos por técnicas dependentes de cultivo. Também, apresentam uma diversidade muito maior de colonizadores, mostrando um potencial campo de estudos. O globo ocular pode ter uma diversidade muito maior de espécies e potenciais agentes patogênicos, do que era esperado. Os principais meios de preservação utilizados no Brasil, levam os antimicrobianos gentamicina e estreptomomicina em sua composição. A utilização desses antibióticos já se mostra controversa, a medida em que muitas espécies bacterianas isoladas dos meios de preservação e de infecções pós transplante, são resistentes a gentamicina e algumas, resistentes a gentamicina e estreptomomicina. A necessidade de se rever os antimicrobianos utilizados nos meios de preservação, seja por sua eficiência ou pelo grupo alvo a ser atingido, já que estudos indicaram a presença de uma grande quantidade de bactérias Gram-negativas no bioma ocular, pode levar ao desenvolvimento de um protocolo unificado para utilização no Brasil.

Palavras-chave: Microbiota ocular. Transplante de córneas. Meios de preservação. Resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Corneal transplantation provides visual restoration at a low cost. Currently transplantation is the main treatment for corneal curvature issues and corneal transparency disorders. However, Brazil lacks a unified protocol on preservation, storage, and antibiotic treatment of corneal tissue. The main concern with the efficiency of preservation and decontamination of corneas is the possibility of postoperative eye infection due to pathogen transference. This article performed a survey of theoretical references that have been published and made available in governmental digital platforms, as well as scientific journals found in Capes and PubMed resources. This survey reveals that studies based on microorganism cultures presented coagulase-negative *Staphylococcus* in 30 to 100% of conjunctival isolated samples. *Streptococcus*, *Corynebacterium*, and *Propionibacterium* were found in smaller amounts. The number of gram-negative bacteria, such as *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* and *Acinetobacter*, was much lower in this kind of study. On the other hand, studies based on independent cultivation techniques showed *Pseudomonas* as the main conjunctival colonizer, contrary to the results obtained by cultivation-dependent techniques. These studies also show greater variety of colonizers, which could be a new field of study, as the human eye might have more species of bacteria and pathogens than anticipated. The main means of corneal preservation used in Brazil contain the antimicrobials gentamicin and streptomycin in their composition. The use of these antibiotics is controversial, as many bacterial species isolated from preservation means and postoperative infections are resistant to gentamicin and some resistant to both gentamicin and streptomycin. These studies presenting a large quantity of gram-negative bacteria in the ocular biome show that it is necessary to reassess the antimicrobials used in corneal preservation, which can lead to the development of a unified protocol to be used in Brazil.

Keywords: Ocular microbiota. Corneal transplantation. Preservation media. Antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	OBJETIVOS	8
1.1.1	Objetivo geral.....	8
1.1.2	Objetivos específicos.....	8
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	9
3	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	27
	REFERÊNCIAS	28
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL AND TISSUE	
	BANKING	38

1 INTRODUÇÃO

Estima-se, que o número de pessoas com deficiência visual triplique nas próximas décadas, chegando a atingir 115 milhões de pessoas até 2050 (Bourne et al. 2017). Porém, 80% das doenças oculares são consideradas evitáveis, o que demonstra a importância do investimento em políticas públicas de saúde, na área de transplantes. O transplante de córneas proporciona a recuperação da visão a um custo muito baixo (Brown et al. 2014). Atualmente, é o principal tratamento para pessoas que apresentam distúrbios de curvatura ou transparência da córnea (Sousa and Sousa 2018).

No Brasil, o transplante de qualquer órgão ou tecidos deve ser disponibilizado gratuitamente, como forma de universalizar o seu alcance a toda população. O Brasil é um dos poucos países no mundo, em que o custo do transplante é inteiramente coberto pelo sistema público de saúde (Freitas et al. 2019). Ele pode ser realizado em instituições privadas, porém o Sistema Único de Saúde (SUS) é o responsável por coordenar o sistema de transplantes.

Em 2018, foram realizados no país 14.809 transplantes de córnea (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO 2018), apesar disso, esse número ainda é insuficiente para atender as necessidades atuais da população brasileira. O último dado divulgado pelo Ministério da Saúde, sobre as listas de espera para doação, é datado de 2017, onde 12.294 potenciais receptores de córneas, ativos e semiativos, esperavam para realizar o procedimento de transplante.

A necessidade de aumentar a efetivação dos transplantes deve levar em consideração, além das técnicas utilizadas, a manipulação das córneas. A qualidade dos tecidos oculares tem influência no sucesso do procedimento (Cruz et al. 2017). Desde a remoção da córnea até o seu armazenamento, são tomadas medidas de precaução para que não haja contaminação dos tecidos. Estudos vem indicando um aumento de contaminação dos tecidos, com culturas positivas para fungos (Layer et al. 2014; Edelstein et al. 2016; Tran et al. 2019). Assim como o aumento de bactérias multiresistentes a antimicrobianos (Shalchi et al. 2011; Franci et al. 2015; Sharma et al. 2019).

O descarte de córneas, além de reduzir as chances de transplantes efetivados, representa custos ao setor público. A perda de material por apresentar contaminação microbiológica, é um fator que não contribui com a diminuição das filas de espera. Com metodologia adequada, muitas vezes, essa perda poderia ser evitada. Estudos que apresentaram dados de bancos de olhos brasileiros, onde mostraram que o descarte de córneas

pode chegar a 46,41% dos tecidos (Saldanha et al. 2009; Santos et al. 2010; Freitas et al. 2019).

O descarte dos tecidos pode ocorrer por diversos motivos, sorologia positiva, contaminação do tecido, viabilidade da córnea, contra indicações clínicas (Bruinsma et al. 2013; Freitas et al. 2019). Os bancos de olhos são extremamente criteriosos na seleção dos tecidos selecionados. É obrigatória a realização dos testes sorológicos Anti-HIV 1 e 2, HBsAg, Anti-HBc total e Anti-HCV, assim como é contraindicada a enucleação onde a *causa mortis* tenha sido: morte de causa desconhecida; hepatite viral aguda; sepse; raiva; AIDS; doença de Creutzfeldt-Jakob; panencefalite sub-aguda esclerosante; rubéola congênita; linfomas ativos disseminados; leucemias; síndrome de Reye; encefalite viral ativa ou encefalite de origem desconhecida ou encefalopatia progressiva; leucoencefalopatia multifocal progressiva; doença neurológica de diagnóstico indeterminado (Anvisa 2008).

O descarte de material é realizado justamente por precaução, pois como em qualquer transplante, pode ocorrer a transmissão de patógenos do doador ao receptor. Cerca de 80% da superfície ocular, de olhos enucleadas, apresenta bactérias colonizadoras (Panda et al. 2006). Essas bactérias, assim como fungos, se levadas com o enxerto, podem acarretar casos graves de infecções intraoculares (Antonios et al. 1991; Al-Assiri et al. 2006; Tran et al. 2019).

A legislação brasileira permite que a enucleação das córneas seja feita até 6 horas após a morte, a não ser que o corpo fique refrigerado (6 a 8 °C), onde é permitida a enucleação até 24h após a morte (Anvisa 2008). Estudos têm mostrado que o tempo de armazenamento pode aumentar as taxas de contaminação em 0,5 a 11%, dependendo dos antimicrobianos utilizados (Armitage, W. John, Easty 1997; Borderie and Laroche 1998; Khouani et al. 2014). Estudos sugerem que após 5 dias de armazenamento, ocorra um aumento nas chances de contaminação de 6 a 7% (Zanetti et al. 2005; Fontana et al. 2009).

No Brasil, não há um banco de dados para acompanhamento após realizado o transplante. Portanto, há apenas o dados do número de transplantes realizados, mas não do sucesso das cirurgias ou se ocorreram complicações após a realização dos transplantes. Esse tipo de acompanhamento, se mostra essencial a medida em que se pode correlacionar infecções à microrganismos presentes nos doadores. A epidemiologia dos transplantes, poderia acarretar em medidas mais efetivas de descontaminação de tecidos e, até mesmo, no tratamento pós operatório.

Atualmente não há padronização nos protocolos de armazenamento de córneas, como a solução indicada, antimicrobianos utilizados, temperatura de armazenamento ou tempo de armazenamento. Cabe as instituições de ensino e pesquisa, promoverem estudos que

minimizem as perdas de material e aprimorem a qualidade dos serviços públicos de saúde. O objetivo do trabalho é realizar um levantamento sobre a microbiota ocular de doadores de córnea a fim de verificar uma possível correlação com infecções pós-transplante, com o intuito de fornecer dados para futuro aprimoramento de protocolos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar levantamento sobre a microbiota ocular de doadores de córnea a fim de verificar uma possível correlação com infecções pós-transplante.

1.1.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos do trabalho:

- a) fazer um levantamento de dados disponibilizados em plataformas digitais governamentais sobre transplantes de córnea realizados no país;
- b) realizar levantamento sobre as principais causas de inviabilidade de córneas para transplante;
- c) realizar um levantamento de microrganismos presentes em córnea de doadores com potencial patogênico;
- d) verificar a possível relação de microrganismos patogênicos presentes no globo ocular de doadores de córneas com infecções pós-transplante.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DE DOADORES DE CÓRNEA EM CASOS DE INFECÇÃO PÓS-TRANSPLANTE

Catiusca Reali¹ e Mercedes Passos Geimba²

¹Curso de Especialização em Microbiologia Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500 – Bairro Farroupilha, Porto Alegre - RS, CEP 90.035-190. catusscar@gmail.com, +55 51 9993 84411.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500 – Bairro Farroupilha, Porto Alegre - RS, CEP 90.035-190.

Resumo

O transplante de córneas proporciona a recuperação da visão a um custo muito baixo. Atualmente, é o principal tratamento para pessoas que apresentam distúrbios de curvatura ou transparência da córnea. No entanto, no Brasil, não há um protocolo unificado sobre os meios de preservação, tempo de armazenamento e antibióticos utilizados. A preocupação é que agentes patogênicos sejam transferidos aos receptores de transplantes, causando infecções oculares após o transplante. Estudos baseados em cultivo de microrganismos, trazem *Staphylococcus* coagulase negativa em 30 a 100% das amostras isoladas de conjuntivas. Em menor quantidade estão *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Bactérias Gram-negativas aparecem em número muito inferior, representadas pelos gêneros *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* e *Acinetobacter*. Já os resultados baseados em técnicas independentes de cultivo trazem *Pseudomonas* como a principal colonizadora da conjuntiva, contrariando os resultados obtidos por técnicas dependentes de cultivo. Também, apresentam uma diversidade muito maior de colonizadores, mostrando um potencial campo de estudos. O globo ocular pode ter uma diversidade muito maior de espécies e potenciais agentes patogênicos, do que era esperado. Os principais meios de preservação utilizados no Brasil, levam os antimicrobianos gentamicina e estreptomicina em sua composição, porém diversos estudos têm mostrado que as bactérias presentes nos meios de preservação são resistentes a esses antibióticos. Esses dados apontam para a necessidade de uma reavaliação da eficiência desses meios de preservação na descontaminação das córneas para transplante.

Palavras chave: Microbiota ocular. Transplante de córneas. Meios de preservação. Resistência a antimicrobianos.

Introdução

Atualmente, o maior número de transplantes de tecidos, realizados no mundo, é o de córneas (Whitcher et al. 2001). Apesar desse dado, o número de doadores ainda se mostra insuficiente, quando comparado ao número de pacientes que aguardam em filas de transplante. Um levantamento realizado em 2017, estima a necessidade anual de transplantes de córnea no Brasil em 18.547, já o número de transplantes realizados é de 15.212 (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO 2017). A perda ou inviabilidade dos tecidos se torna uma preocupação, na medida em que esse fica indisponível para transplante.

A contaminação microbiológica é um dos motivos do maior número de descartes de córneas em bancos de olhos (Gruenert et al. 2017). Ao contrário da maior parte dos medicamentos, utilizados na oftalmologia, onde se espera que aumente a eficácia ao longo de anos de estudos e melhoramento, os antimicrobianos têm a eficácia diminuída pelo aumento da resistência de microrganismos (Ta et al. 2003). Por esse motivo, é de extrema importância que se conheça o microbioma ocular, a fim de identificar a relação de proteção formada pela própria microbiota comensal (Grzybowski et al. 2017) e identificar possíveis patógenos, responsáveis por infecções pós-transplante.

À medida em que se compreende a relação complexa, que se dá entre os microrganismos que compõem a microbiota ocular, é possível formular ações mais específicas de prevenção ou de tratamento. Como prevenção às infecções, antibióticos são utilizados junto às soluções de armazenamento. Eles são adicionados no intuito de realizar a descontaminação das córneas, porém essas soluções não têm se mostrado 100% eficientes. No Brasil, os principais antimicrobianos utilizados em soluções de armazenamento, são Gentamicina e Estreptomicina (Pereira MLM, Santos AMC, Passos MC 2002), porém estudos já mostram que diversas espécies bacterianas apresentam resistência a esses antibióticos (Farrell et al. 1991; Eastlund 2006).

Até o momento, não há um protocolo que uniformize a utilização de meios de armazenamento, antimicrobianos mais eficientes, temperatura e tempo de estocagem de córneas. A realização de estudos comparando esses métodos se mostra necessária, a medida que o aprimoramento da metodologia poderá resultar em uma perda menor de material, assim como, evitar que microrganismos do doador ou, que cresceram junto aos meios de preservações de córneas, sejam transmitidos aos receptores, já que isso pode causar endoftalmite graves e até mesmo, a perda do globo ocular. Este artigo de revisão tem como objetivo realizar levantamento sobre a microbiota ocular de doadores de córnea, para verificar

uma possível correlação com infecções pós-transplante, a fim de auxiliar futuros estudos sobre metodologias e protocolos de armazenamento de córneas no Brasil.

Transplantes de córnea no Brasil

A córnea é a interface entre o olho e o ambiente externo, além da função de proteção, é a principal superfície de refração do olho (Niederhorn 2011). Quando a sua qualidade está comprometida, podem ocorrer diversos transtornos na visão, incluindo a sua perda completa. Dentre as principais causas da cegueira estão: catarata (51%), glaucoma (8%), degeneração macular relacionada a idade (5%), cegueira infantil e opacidade da córnea (4%), erros refrativos não corrigidos e tracoma (3%), retinopatia diabética (1%) e causas indeterminadas (21%) (Pascolini and Mariotti 2012). Pesquisas mostram que as doenças de córneas representam as principais causas das cegueiras reversíveis no mundo (Pascolini and Mariotti 2012; Cruz et al. 2017) e o transplante de córneas vem a ser um importante tratamento para recuperar a visão.

No Brasil o Sistema Único de Saúde (SUS) é responsável por coordenar o sistema de transplantes, que deve ser disponibilizado a toda população do país sem custos, universalizando o acesso aos transplantes e tratamento. A Política Nacional de Transplantes está disciplinada na Lei nº 9.434/97 e Lei nº 10.211/01. Os transplantes podem ser realizados por instituições públicas ou privadas, porém o procedimento deve ser gratuito, conforme disposto em lei.

Apesar do SUS coordenar o sistema de transplantes, há certa dificuldade de se estimar quantos transplantes de córnea foram bem-sucedidos, pois não há um banco de dados centralizado para acompanhamento dos transplantados, no entanto, o Ministério da Saúde divulga dados sobre o número de transplantes realizados no país. A Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) traz em sua última divulgação de dados de transplantes de córnea que, no ano de 2018, foram realizados 14.809 transplantes. Os dados da ABTO são divulgados trimestralmente. O Ministério da Saúde divulgou, em sua plataforma digital, dados sobre transplantes por regiões, de 2011 a 2017. Infelizmente, desde então, esses dados não foram mais atualizados. Foi na região sudeste onde ocorreu o maior número de transplantes de córnea em 2017, 8.213. Sendo São Paulo o Estado com o maior número de transplantes realizados (69.4%). Já a região sul, realizou, no mesmo ano, 2.125 transplantes de córnea, onde o Rio Grande do Sul representou 32,2% (Fig. 1).

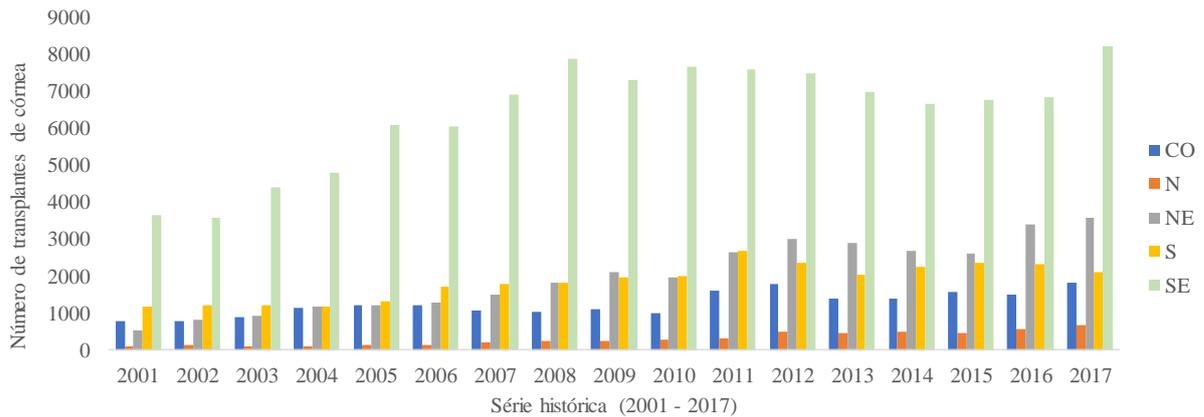


Fig 1 Série histórica do número de transplantes de córnea realizados no Brasil entre 2001 e 2017, nas seguintes regiões: centro oeste (CO); norte (N); nordeste (NE); sul (S) e sudeste (SE). Figura elaborada pela autora a partir de dados disponibilizados no site do Ministério da Saúde, Brasil

O Rio Grande do Sul teve o maior número de transplantes realizados entre os anos 2011 e 2012, 918 e 882 transplantes de córnea, respectivamente (Fig. 2). Desde então, não tem mais atingido o número de transplantes realizados nos anos citados, sendo em 2017 realizados somente 699 transplantes, um pequeno aumento se comparado ao ano anterior, porém 2016 teve o menor número de transplantes de córnea dos últimos 6 anos.

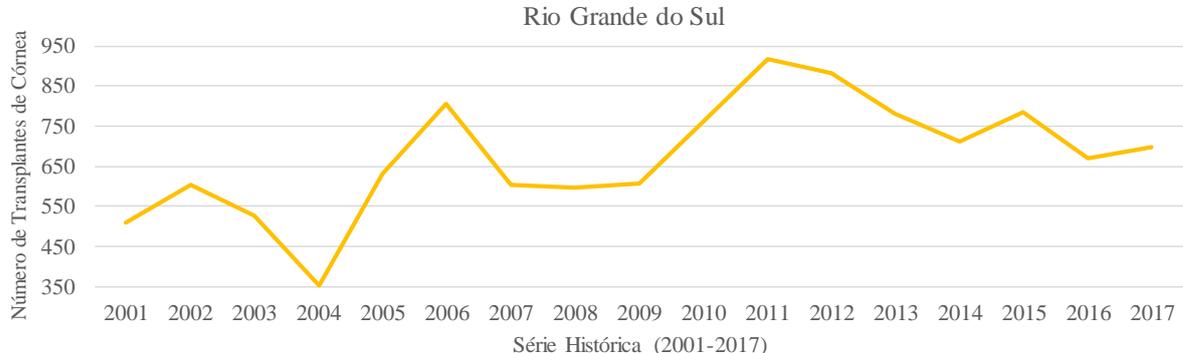


Fig 2 Série histórica do número de transplantes de córnea realizados no Rio Grande do Sul, entre 2001 e 2017. Figura elaborada pela autora a partir de dados disponibilizados no site do Ministério da Saúde, Brasil

Apesar do transplante de córneas ser o transplante de tecidos mais realizado no mundo (Whitcher et al. 2001), a demanda de doações não está sendo suprida, principalmente pelo número insuficiente de doadores (Gain et al. 2016). Os números da ABTO chamam atenção, em 2018 dentre os potenciais doadores de órgão do Rio Grande do Sul, apenas 35,64% foram efetivados, ou seja, de 505 potenciais doadores, apenas 180 doadores efetivos e desses, 141 cujos órgãos foram transplantados. Na lista de espera para doações de córnea encontram-se 8.788 pacientes ativos, os números variam muito por Estado, em São Paulo existem 2.273 pacientes em lista de espera, já no Rio Grande do Sul, este número cai para 49. Os números são datados de dezembro de 2018 e ainda não foram divulgados dados mais atualizados.

Segundo o Ministério da Saúde, dentre os motivos para o baixo número de efetivação nas doações está a negativa familiar, responsável por 43% das negativas, nos casos de entrevistas com os familiares, porém 31% dos familiares nem chegaram a ser entrevistados. Os motivos para não realização das entrevistas não foram divulgados pelo Ministério, assim como não foram divulgados dados discriminando os tipos de doação.

Devido ao número insuficiente de doadores de córnea e às listas de espera, os Bancos de Olhos acabam tendo um papel fundamental não só na captação, mas principalmente, em dar boas condições de armazenamento e conservação para posterior efetivação dos transplantes (Santos et al. 2010). Estudos indicam que, mesmo após a autorização para doação, uma grande parcela das córneas é descartada e não há a efetivação do transplante. Em um estudo realizado no Estado do Paraná, entre os anos de 2011 e 2015, 45,6% das córneas doadas foram descartadas, por diversos motivos, no Brasil esse número corresponde a 29,5% (Freitas et al. 2019). Dentre os motivos do descarte estão, em maior número, a sorologia positiva, viabilidade e qualidade da córnea e, ainda que, em menor número, a contaminação do tecido ocular.

Microbiota da superfície ocular humana

A microbiota normal é definida como as espécies de microrganismos presentes na maioria dos indivíduos avaliados, em uma localização particular (Kugadas and Gadjeva 2016). A conjuntiva, assim como margens da pálpebra e lágrimas, apresenta uma quantidade muito menor de espécies microbianas, quando comparada a outras mucosas, como a superfície da mucosa oral. Mesmo em menor número, a superfície ocular está continuamente exposta ao ambiente e a diferentes espécies de microrganismos (Willcox 2013). O desequilíbrio na microbiota normal ou a inserção de espécies transitórias pode ter como consequência o aparecimento de algumas doenças (Huang et al. 2016).

A microbiota da superfície ocular pode ser alterada por diversos fatores: ambientais, doenças, uso de antibióticos (Miller and Iovieno 2009; Zegans and Van Gelder 2014), dentre outros. A síndrome do olho seco tem sido constantemente associada às condições inflamatórias da superfície ocular (Lee et al. 2012), pois a lubrificação realizada pela lágrima, que contém compostos antimicrobianos (McDermott 2013) contribui para que poucas espécies de microrganismos se estabeleçam na mucosa ocular.

Estudos baseados em métodos dependentes de cultivo têm mostrado uma predominância de bactérias Gram-positivas presentes na conjuntiva humana, especialmente os

Staphylococcus coagulase negativa (SCN), isolados em 20 a 80% dos *swabs* de conjuntiva e em 30 a 100% dos *swabs* de pálpebras, assim como os gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, e *Propionibacterium* (*P.acnes*) (Tilman et al. 2002; Araújo and Scarpi 2004; Miller and Iovieno 2009; Willcox 2013; Doan et al. 2016; Kugadas and Gadjeva 2016), com menor ocorrência *S.aureus*, *Micrococcus* sp. *Bacillus* sp. *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. (Willcox 2013). Também, embora em menor número, alguns grupos de bactérias Gram-negativas, tais como *Haemophilus* sp., *Neisseria* sp. (Miller and Iovieno 2009), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *Proteus* sp. e *Acinetobacter* sp. (Elander et al. 1992; Graham et al. 2007; Campos et al. 2009; Hsu et al. 2013; Willcox 2013), assim como alguns grupos de fungos (Willcox 2013). Já nas pálpebras e/ou lágrimas podem ser encontradas, em maior frequência, os SCN, como também *Propionibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *S. aureus*, *Micrococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Novamente, em menor número, bactérias Gram-negativas, tais como: *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp., *Neisseria* sp. e *Proteus* sp.(Willcox 2013).

Nos últimos anos, houve uma intensificação da utilização de métodos de identificação independentes de cultivo, como PCR e sequenciamento utilizando o Gene 16SrRNA. Através dessa nova abordagem, outros gêneros estão sendo identificados como possíveis colonizadores da conjuntiva ocular (Huang et al. 2016). Dentre os gêneros encontrados por pesquisadores, através de técnicas independentes de cultivo e, não citados acima, estão: *Millisia*, *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Simonsiella*, *Veillonella* (Huang et al. 2016), *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Aquabacterium*, *Sphingomonas*, *Streptophyta* e *Methylobacterium* (Dong et al. 2011).

No mesmo estudo, Dong et.al. (2011) apresentam 12 gêneros bacterianos constituindo o microbioma da conjuntiva, ordenados por frequência: *Pseudomonas* sp. (20%), *Propionibacterium* (20%), *Bradyrhizobium* (16%), *Corynebacteria* (15%), *Acinetobacter* (12%), *Brevundomonas* (5%), *Staphylococcus* (4%), *Aquabacterium* (2%), *Sphingomonas* (1%), e *Streptococcus* (1%). Alguns outros estudos trazem *Pseudomonas* dentre as espécies mais abundantes da conjuntiva. *Pseudomonas*, *Elizabethkingia*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Delftia*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* representando 63.6% das sequências (Doan et al. 2016), *Pseudomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Acinetobacter* sp. dentre as mais abundantes (Lee et al. 2012; Zhou et al. 2014).

A frequência de espécies, apresentadas por métodos independentes de cultivo, nesses estudos, surpreende na medida em que o gênero *Pseudomonas* aparece em elevada frequência e não mais o SCN, como em resultados apresentados por técnicas dependentes de cultivo.

Bactérias Gram-negativas são as menos abundantes por isolamento e identificação de gêneros bacterianos por métodos dependentes de cultivo. Os diferentes locais do olho apresentam microbiota diferenciada onde, *Pseudomonas* sp. se mostrara mais frequente nas pálpebras e na conjuntiva, porém não tão frequentemente encontradas na superfície ocular (Ozkan et al. 2019).

A metodologia de análise dependente de cultivo, acaba favorecendo microrganismos com crescimento mais rápido e menos fastidiosos. Os meios de cultivo, assim como as condições de crescimento fazem uma seleção de espécies, o que não ocorre em métodos independentes de cultivo. Estima-se que apenas 1% dos microrganismos seja cultivável por técnicas de rotina (Amann et al. 1995). Além da metodologia, condições ambientais, sazonalidade e faixa etária podem ser fatores importantes na diferença dos dados apresentados (Miller and Iovieno 2009; Zhou et al. 2014; Zegans and Van Gelder 2014). Nos estudos avaliados, não houve diferença estatística na microbiota ocular entre homens e mulheres, mas essa diferença aparece entre faixas etárias avaliadas (Dong et al. 2011; Doan et al. 2016).

A introdução de técnicas independentes de cultivo e de análises de metagenômica mostraram uma microbiota ocular mais parecida com o da pele e não com o de outras mucosas, como a boca e garganta (Grice et al. 2008). Estudos inferem que o microbioma ocular pode ter se desenvolvido como resultado de interações físicas entre a pele nas margens das pálpebras ou os dedos com a superfície ocular (Berry et al. 2002; Graham et al. 2007), assim como partículas de poeira, água, pólen etc. É importante definir quais os microrganismos são transitórios e possíveis causadores de distúrbios na composição do microbioma e, quais microrganismos são comensais e contribuem para a manutenção desse equilíbrio (Huang et al. 2016).

Microbiota relacionada a infecções oculares

Apesar de ser conhecido que a microbiota normal auxilia na proteção do olho, algumas espécies presentes na conjuntiva contribuem com o aparecimento de doenças infecciosas e autoimunes do olho, tais como ceratite, conjuntivite, endoftalmite e síndrome do olho seco (Willcox 2013). Por esse motivo, é importante conhecer e distinguir a microbiota comensal da microbiota transitória. Mesmo com o aumento de estudos utilizando técnicas mais sensíveis, não há consenso sobre quantos filotipos realmente contribuem para o equilíbrio microbiano ocular e, compõem a microbiota normal, assim como não se sabe exatamente qual a relação da adição ou exclusão de espécies (Huang et al. 2016).

Até 82% das endoftalmites pós-cirúrgicas, em pacientes que reverteram cataratas, podem ser causadas pela microbiota ocular (Speaker et al. 1991). Bactérias são os principais agentes causadores de endoftalmites e os patógenos Gram-positivos responsáveis por 60 a 80% das infecções agudas, sendo *Staphylococcus* coagulase negativa o microrganismo mais comumente isolado (Gray et al. 2002; Durand 2013; Grzybowski et al. 2017), em menor quantidade cocos Gram-positivos e *Propionibacterium acnes* (Durand 2013). Em estudos avaliando 55 casos de endoftalmite, acometidas pós-transplante de córnea, 44 foram de origem bacteriana com cultura comprovada, sendo o mesmo microrganismo isolado do receptor e do doador em 56,8% dos casos (Kloess et al. 1993). Esses dados ressaltam a importância de compreender e monitorar a distribuição de microrganismos e infecções oculares e sua resistência a antimicrobianos para melhor adequar o tratamento pré, peri e pós-operatório (Grzybowski et al. 2017). O aumento da incidência de infecções fúngicas, pós transplantes de córneas, também aponta para a necessidade de revisão de métodos de seleção de material (Tsui et al. 2016).

Bactérias Gram-negativas são muito comuns na superfície ocular de pessoas que utilizam lentes de contato (Boost et al. 2017), sendo que o gênero *Pseudomonas* aparece dentre as bactérias mais abundantes (Zhang et al. 2017), assim como aparece, também, na microbiota da superfície de pessoas saudáveis, em análises realizadas através de técnicas independentes de cultivo. Outros gêneros bacterianos, incluindo bactérias Gram-positivas, também são relatados como presentes no microbioma de usuários de lentes de contato, são eles: *Methylobacterium*, *Lactobacillus* e *Acinetobacter* e em menor número *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* spp (Zhang et al. 2017). Sabe-se que o risco de infecções em usuários de lentes de contato é aumentada, justamente pela falta de contato com o filme lacrimal e de proteínas antimicrobianas presentes nele, mas também pela fricção mecânica na superfície ocular, onde hoje se sabe, não é estéril, ao contrário, apresenta uma grande quantidade de microrganismos.

Em estudo avaliando Gram ou culturas positivas, em doares de tecidos de córnea e relacionando a casos de infecção pós-transplante, de 46 resultados positivos, 42 foram isoladas bactérias, 2 *Candida*, 1 *Acanthamoeba* e 1 levedura de brotamento inespecífica. Dentre as espécies bacterianas 11 foram SCN, 8 foram *Propionibacterium acnes* e, em menor número, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus viridans*. Porém, foi possível correlacionar a infecção no receptor da córnea, apenas para *Candida* (Garg et al. 2013). Os resultados encontrados pelos autores corroboram com outros estudos, já citados, onde há uma

prevalência dessas espécies em métodos dependentes de cultivo, porém, deve-se levar em consideração as limitações implicadas pela metodologia. O estudo também apresentou 10 culturas positivas, apenas com resultados de coloração de Gram, não tendo os gêneros ou espécies identificados, não sendo possível correlacionar os agentes com infecções posteriores. Outros estudos de caso também relataram a transmissão de *Candida* sp. do doador para o hospedeiro (Koenig et al. 2009; Villarrubia and Cano-Ortiz 2014; Tsui et al. 2016)

Farrel et al. (1991) avaliaram 446 tecidos de córnea, onde 14,1% dos crescimentos em cultura foram positivos. As espécies mais abundantes foram *Streptococcus* (41%), *Propionibacterium* (23%) e *Staphylococcus* (22%), sendo a maior parte das espécies resistentes a gentamicina. Apesar do artigo não relacionar as espécies encontradas às endoftalmites nos receptores, os autores inferem que conhecer os agentes patogênicos serve para selecionar antibióticos para uso na cirurgia e, também, no período pós-operatório, assim como para modificar os meios de preservação em bancos de olhos, já que a maior parte das espécies encontradas eram resistentes a gentamicina.

Os estudos, que relacionam os agentes infecciosos presentes em doadores às endoftalmites em receptores, foram todos desenvolvidos com técnicas que utilizam o cultivo de microrganismos. A maior parte dos estudos não encontra correlação entre doador e receptor, corroborando com os dados já mencionados (Gomes et al. 1995; Borowsky et al. 2008). No entanto, os isolados de amostras oculares não são necessariamente os agentes causadores de infecções oculares, já que ocorre simultaneamente a presença de diversas bactérias na superfície ocular (Eguchi et al. 2017). Técnicas dependentes de cultivo, apesar de menos precisas, ainda são as mais utilizadas, pelo baixo valor da análise e facilidade em se obter resultados, já que técnicas mais robustas dependem de sequenciamento e análises de bioinformática.

A presença de agentes patogênicos na cultura aumenta a probabilidade de endoftalmites em até 1%, já para fungos, poderia chegar a 1,23%, sendo que a identificação precoce do agente infeccioso permitiria um tratamento agressivo precoce e poderia prevenir danos ou sequelas, como submeter o paciente a uma nova cirurgia (Garg et al. 2013). Lembrando que as técnicas, mais comumente utilizadas, poderiam estar subestimando as espécies presentes, portanto os agentes infecciosos não estariam aparecendo nas avaliações dos contaminantes. A diferença entre os resultados obtidos em cultura convencional e exames de biologia molecular poderia afetar resultados clínicos (Eguchi et al. 2017).

Seleção de córnea e soluções de armazenamento

No Brasil, a Resolução 67/08, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta as contraindicações na utilização de córneas doadas, tais como morte por sepsse, soropositivos para HIV, hepatite viral aguda. Também diagnóstico positivo para raiva e outras doenças associadas a microrganismos, com o intuito de não transferir patógenos aos receptores. Mesmo em doadores onde a *causa mortis* ou o histórico do doador não são contraindicados para a doação de córneas, a presença de microrganismos em olhos enucleados é inevitável, portanto, a avaliação do material é importantíssima para que os microrganismos não sejam levados do enxerto para o interior do olho receptor. Como controle da contaminação, o material enucleado recebe banho de imersão em colírio e, após, o material é armazenado em soluções contendo antibióticos. Estudos onde foram analisadas a conjuntiva de doadores mostra uma contaminação de 40 a 100% antes de qualquer tratamento e preservação da córnea (Araújo and Scarpi 2004), porém, mesmo após este tratamento, as córneas não se tornam estéreis, podendo ainda carregar algum tipo de microrganismo.

No Brasil, a temperatura de armazenamento, assim como o tempo, é definido pela ANVISA na Resolução N° 67, de 30 de setembro de 2008, onde se indica o armazenamento em refrigeradores com controle de temperatura de 2 a 8°C. Essa metodologia é a mais difundida no mundo e a única utilizada na América do Norte (Armitage 2011), é relativamente eficiente e facilmente reproduzida em bancos de olhos. Já na maior parte dos bancos de olhos europeus, utilizam-se temperaturas de armazenamento das córneas, de 31 a 37°C. Essa temperatura ofereceria vantagens, quando comparada ao armazenamento a 4°C, pois os microrganismos são metabolicamente mais ativos em temperaturas mais altas, pois aumentado a eficiência dos antimicrobianos, aumenta também o tempo de armazenamento pela viabilidade de células endoteliais (Armitage 2011; Gruenert et al. 2017).

O tempo de armazenamento dos órgãos determina a metodologia escolhida. Para períodos mais longos, de até 48 dias, a temperatura recomendada é de 31 a 37°C, já para períodos curtos, até 14 dias, a temperatura recomendada é de 4°C (Jeng 2006). Na maior parte do mundo, são utilizados períodos menores de armazenamento, por ter uma necessidade constante de doações, ou seja, a demanda é maior do que a quantidade de córneas disponíveis para doação. Isso explicaria a frequente utilização de temperaturas de armazenamento a 4°C. O interessante em se utilizar períodos mais longos de armazenamento seria a possibilidade de fortalecer os testes de diagnósticos de patógenos, possíveis causadores de infecções, antes da realização do transplante (Frueh and Böhnke 2000), porém, um problema de estocar córneas por um período mais longo, pode vir a ser as possíveis alterações sofridas na composição do meio de estoque (Engelmann et al. 1998).

Um estudo realizado na Nova Zelândia, comparando meios de preservação de córneas, mostrou o Optisol-GS com um tempo de estocagem ideal médio de 3,5 dias (Patel et al. 2005), contrariando informações dos fabricantes, onde o tempo de utilização indicado é de até 14 dias. No Brasil, os meios de preservação de médio prazo utilizados são Optisol-GS (Bausch e Lomb, E.U.A.) e o Eusol-C (Al.Chi.Mia, Itália), o tempo de preservação endotelial da córnea, para ambos, é de 14 dias, 64% dos Bancos de Olhos no país utilizam soluções de preservação com gentamicina e estreptomicina (Pereira MLM, Santos AMC, Passos MC 2002). Já na Europa, os antimicrobianos utilizados junto às soluções de armazenamento são com mais frequência penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Armitage 2011).

A utilização da estreptomicina junto a gentamicina, com o intuito de aumentar o espectro antimicrobiano contra bactérias contaminantes, diminuindo a possibilidade do desenvolvimento de endoftalmite, foi introduzido no Optisol GS. Um problema da utilização do Optisol GS ou Optisol G, que tem somente gentamicina em sua composição, no Brasil, seria a temperatura de armazenamento utilizada, que é de 4°C. A gentamicina e estreptomicina sofrem um decréscimo em sua atividade a 4°C, quando comparada a 37°C, além disso, seria necessário deixar a córnea em solução de estoque em temperatura ambiente por 3 horas, antes da refrigeração (Durand 2013). Ainda, antes de realizar o procedimento cirúrgico, seria necessário deixar, mais uma vez, a córnea em temperatura ambiente, por cerca de 1 hora (Lass et al. 1993). Apesar disso, há relatos de que, após a introdução do meio Optisol GS houve um decréscimo de 77% das endoftalmite causadas por bactérias, em comparação com fungos e um aumento de 3.4 vezes de endoftalmite, causadas por fungos quando tempo de estocagem das córneas era superior a 4 dias (Hassan and Wilhelmus 2005).

A gentamicina se tornou um antibiótico amplamente utilizado nas soluções de armazenamento de córneas em todo o mundo (Eastlund 2006), porém um estudo realizado ainda em 1991 mostrou que bactérias resistentes a gentamicina já eram encontradas nas córneas estocadas, mesmo que essas nem sempre estivessem relacionadas a infecções pós-transplante (Farrell et al. 1991). Embora o número comprovado de infecções pós-operatórias seja baixo, Eastlund (2006) sugere que esses dados sejam pouco estudados. Os pacientes que apresentam um quadro de infecção pós-operatório nem sempre retornam ao hospital ou ao profissional responsável pelo transplante, por isso nem sempre esse dado é quantificado. Assim como, seria necessário o isolamento do microrganismo presente na córnea do doador para comparar com o microrganismo causador da infecção pós-transplante. Esse acompanhamento é realizado em poucos casos, portanto esse dado poderia estar sendo subestimado. As contra indicações do uso de córneas de pacientes com morte por seps,

ventilação mecânica ou outra enfermidade, citadas na RDC 67/2008, são justamente para evitar que patógenos sejam transmitidos junto com o tecido, como já foi comprovado por diversos estudos de caso (Gandhi et al. 1981; Leveille et al. 1983; Seedor et al. 1987; Robert et al. 2002; Spelsberg et al. 2002).

Os gêneros *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus*, assim como difteróides, resistentes a gentamicina, são comumente encontrados nas soluções de armazenamento (Eastlund 2006). Em estudo avaliando a cultura de córneas em soluções de armazenamento com gentamicina e estreptomicina foi relatado crescimento de microrganismos em 72,5% das amostras (Araújo and Scarpi 2004), mostrando a ineficiência dos meios de preservação, quanto a descontaminação das córneas. O mesmo estudo mostrou que dos 76 isolados identificados, 81,6% são bactérias Gram-positivas, por ordem de frequência, SNC em 44,8% dos casos, *Corynebacterium* sp. em 19,7%, *Staphylococcus aureus* em 15,8% e *Bacillus* sp. em 1,3%. Lembrando que *Staphylococcus* coagulase negativa é o microrganismo mais comumente isolado em endoftalmite (Ciulla et al. 2002; Patel et al. 2005). Outro estudo, baseado em soluções de armazenamento somente com gentamicina, apresentou 81% dos *Streptococcus*, 60% dos *Propionibacterium* e 71% dos *Staphylococcus* resistentes a esse antibiótico, o mesmo estudo mostrou que todos os isolados foram sensíveis à Vancomicina (Farrell et al. 1991). Assim como um estudo de caso relatado por Khokhar et al. (2002), indicando que a espécie *Alcaligenes faecalis*, resistente à Vancomicina, foi responsável por infecção na córnea transplantada.

Em estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, entre os anos de 2001 a 2003, analisando a positividade em halos doadores córneo-esclerais, preservados em Optisol GS, dos 63 halos analisados, 11 apresentaram culturas positivas e, desses, quatro foram por *Staphylococcus epidermidis*, um por *Staphylococcus aureus*, um por *Serratia* sp, um por *Pseudomonas aeruginosa*, todas resistentes a gentamicina (Borowsky et al. 2008). Baer et al, ainda em 1988, encontraram *Streptococcus viridans* resistentes a esse antibiótico e relataram 3 casos de endoftalmite causadas por este patógeno. Assim como em um estudo publicado por Fong et al. (1988) onde não foram eliminados estafilococos, estreptococos e fungos. Para Broniek et al. (2018) a gentamicina não foi eficaz em inibir a replicação bacteriana durante o armazenamento da córnea, em estudo realizado com cultura bacteriana em córneas armazenadas em meio Eusol C.

O tempo de armazenamento das córneas se mostra determinante no aumento do risco de contaminação (Hassan and Wilhelmus 2005). Segundo alguns estudos, o risco de contaminação aumenta após 5 dias de armazenamento (Antonios et al. 1991; Pels and

Vrensen 1999), apesar dos meios de preservação como o Optisol-GS poderem manter as córneas com células endoteliais viáveis por até 14 dias a 4°C (Kanavi et al. 2015). A recomendação da “Eye Bank Association of America - EBAA” é de que a enucleação do bulbo ocular seja realizada, preferencialmente, nas primeiras seis horas após o óbito. Já o reimplante, tem como recomendação ideal, que seja realizado em até 4 dias após a enucleação. Estudos comparando diferentes combinações de antibiótico e antifúngicos se mostram necessários, visando uma melhor efetividade na descontaminação de córneas para doação. Cada vez mais, ocorrem casos de bactérias resistentes a antimicrobianos, mesmo na comunidade onde as córneas para doação normalmente são capturadas. O aumento de resistência a antimicrobianos se torna um desafio, não só no tratamento de doenças causadas por microrganismos, mas também, na descontaminação de órgãos para doação.

Conclusão

Os estudos baseados em técnicas independentes de cultivo, mostraram haver uma diversidade muito maior de bactérias que colonizam o globo ocular, do que se pensava existir. Assim como mostrou que as bactérias presentes em maior frequência são do gênero *Pseudomonas* e não SNC, como nos resultados de estudos baseados em crescimento em meios de cultivo. Os antibióticos presentes nos meios de cultivo utilizados no Brasil, gentamicina e estreptomicina, já se mostram controversos, a medida em que muitas espécies bacterianas isoladas dos meios de preservação e de infecções pós transplante, são resistentes a gentamicina e algumas, resistentes a gentamicina e estreptomicina. A necessidade de se rever os antimicrobianos utilizados nos meios de preservação, seja por sua eficiência ou pelo grupo alvo a ser atingido, já que estudos mostraram haver uma grande quantidade de bactérias Gram-negativas no bioma ocular, pode levar ao desenvolvimento de um protocolo unificado para utilização no Brasil.

Referências

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169
- Antonios SR, Cameron JA, Badr IA, et al (1991) Contamination of Donor Cornea: Postpenetrating Keratoplasty Endophthalmitis. *Cornea* 10:217–220. doi: 10.1097/00003226-199105000-00006

- Araújo MEX dos S, Scarpi MJ (2004) Microbiota bacteriana da conjuntiva de doadores de córnea. *Arq Bras Oftalmol* 67:927–933. doi: 10.1590/S0004-27492004000600016
- Armitage WJ (2011) Preservation of human cornea. *Transfus. Med. Hemotherapy*
- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO (2017) Dimensionamento de Transplantes no Brasil e em cada Estado (2010-2017). *Registro Brasileiro de Transplantes* 23.
- Baer JC, Nirankari VS, Glaros DS. (1988) Streptococcal Endophthalmitis From Contaminated Donor Corneas After Keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 106:517-520. doi:10.1001/archophth.1988.01060130563037
- Berry M, Harris A, Lumb R, Powell K (2002) Commensal ocular bacteria degrade mucins. *Br J Ophthalmol*. 86:1412-1416. doi: 10.1136/bjo.86.12.1412
- Boost M, Cho P, Wang Z (2017) Disturbing the balance: effect of contact lens use on the ocular proteome and microbiome. *Clin Exp Optom* 100:459–472. doi: 10.1111/cxo.12582
- Borowsky CM, Wallau AD, Reetz A, et al (2008) Contaminação de halos doadores córneo-esclerais em ceratoplastia penetrante no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol* 71:13–17. doi: 10.1590/S0004-27492008000100003
- Broniek G, Langwińska-Wośko E, Sybilska M, et al (2018) Prevalence of bacteria and fungi in samples of cornea preservation fluid. *Arch Med Sci* 14:541–546. doi: 10.5114/aoms.2016.58927
- Ciulla TA, Starr MB, Masket S (2002) Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery: An evidence-based update. *Ophthalmology*. 109:13–24. doi: 10.1016/S0161-6420(01)00899-5
- Cruz GKP, Azevedo IC de, Carvalho DP de SRP, et al (2017) Clinical and epidemiological aspects of cornea transplant patients of a reference hospital. *Rev Lat Am Enfermagem* 25:e2897. doi: 10.1590/1518-8345.1537.2897
- Doan T, Akileswaran L, Andersen D, et al (2016) Paucibacterial microbiome and resident DNA virome of the healthy conjunctiva. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 57:5116-5126. doi: 10.1167/iovs.16-19803
- Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, et al (2011) Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 52:5408. doi: 10.1167/iovs.10-6939
- Durand ML (2013) Endophthalmitis. *Clin Microbiol Infect* 19:227–234. doi: 10.1111/1469-0691.12118
- Eastlund T (2006) Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation.

- Cell Tissue Bank 7:147–166. doi: 10.1007/s10561-006-0003-z
- Eguchi H, Hotta F, Kuwahara T, et al (2017) Diagnostic Approach to Ocular Infections Using Various Techniques From Conventional Culture to Next-Generation Sequencing Analysis. *Cornea* 36:S46–S52. doi: 10.1097/ICO.0000000000001338
- Elander TR, Goldberg MA, Salinger CL, et al (1992) Microbial changes in the ocular environment with contact lens wear. *CLAO J* 18:53–5
- Engelmann K, Ventura AS, Drexler D, Staude HJ (1998) A sensitive method for testing the quality of organ culture media and of individual medium components in a cornea bank. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 236:312–9. doi: 10.1007/s004170050084
- Farrell PL, Fan JT, Smith RE, Trousdale MD (1991) Donor cornea bacterial contamination. *Cornea.* 10:381–6. doi: 10.1097/00003226-199109000-00004
- Fong LP, Gladstone D, Casey TA (1988) Corneo-scleral rim cultures: Donor contamination a case of fungal endophthalmitis transmitted by K-Sol stored cornea. *Eye* 2:670–676. doi: 10.1038/eye.1988.123
- Freitas RA de, Dell'Agnolo CM, Melo WA de, et al (2019) Do Donated Corneas Become Transplanted Corneas? The Causes of Discard in Southern Brazil. *Cornea* 38:419–425. doi: 10.1097/ICO.0000000000001856
- Frueh BE, Böhnke M (2000) Prospective, randomized clinical evaluation of optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol.* doi: 10.1001/archophth.118.6.757
- Gain P, Jullienne R, He Z, et al (2016) Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* 134:167–73. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776
- Gandhi SS, Lamberts DW, Perry HD (1981) Donor to host transmission of disease via corneal transplantation. *Surv Ophthalmol* 25:306–310. doi: 10.1016/0039-6257(81)90156-9
- Garg S, Said B, Farid M, Steinert RF (2013) Prevalence of Positive Microbiology Results From Donor Cornea Tissue in Different Methods of Corneal Transplantation. *Cornea* 32:137–140. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182542368
- Gomes JAP, Dana M-R, Dua HS, et al (1995) Positive Donor Rim Culture in Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 14:457–462. doi: 10.1097/00003226-199509000-00003
- Graham JE, Moore JE, Jiru X, et al (2007) Ocular pathogen or commensal: A PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 48:5616–5623. doi: 10.1167/iovs.07-0588
- Gray ND, Miskin IP, Kornilova O, et al (2002) Occurrence and activity of archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ Microbiol* 4:158–168. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00280.x

- Grice EA, Kong HH, Renaud G, et al (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* 18:1043–1050. doi: 10.1101/gr.075549.107
- Gruenert AK, Rosenbaum K, Geerling G, Fuchsluger TA (2017) The influence of donor factors on corneal organ culture contamination. *Acta Ophthalmol* 95:733–740. doi: 10.1111/aos.13402
- Grzybowski A, Brona P, Kim SJ (2017) Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 255:851–862. doi: 10.1007/s00417-017-3608-y
- Hassan SS, Wilhelmus KR (2005) Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 139:685-90 doi: 10.1016/j.ajo.2004.12.016
- Hsu HY, Lind JT, Tseng L, Miller D (2013) Ocular flora and their antibiotic resistance patterns in the midwest: A prospective study of patients undergoing cataract surgery. *Am J Ophthalmol* 155:36-44.e02. doi: 10.1016/j.ajo.2012.06.024
- Huang Y, Yang B, Li W (2016) Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin Microbiol Infect* 22:643.e7-643.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.008
- Jeng BH (2006) Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol* 17:332–337. doi: 10.1097/01.icu.0000233950.63853.88
- Kanavi MR, Javadi MA, Chamani T, et al (2015) Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in Eusol-C. *Cell Tissue Bank* 16:243–247. doi: 10.1007/s10561-014-9466-5
- Khokhar DS, Sethi HS, Kumar H, et al (2002) Postkeratoplasty Endophthalmitis by *Alcaligenes faecalis*. *Cornea* 21:232–233. doi: 10.1097/00003226-200203000-00024
- Kloess PM, Stulting RD, Waring GO, Wilson LA (1993) Bacterial and Fungal Endophthalmitis After Penetrating Keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 115:309–316. doi: 10.1016/S0002-9394(14)73580-9
- Koenig SB, Wirostko WJ, Fish RI, Covert DJ (2009) *Candida* Keratitis After Descemet Stripping and Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 28:471–473. doi: 10.1097/ICO.0b013e31818ad9bc
- Kugadas A, Gadjeva M (2016) Impact of Microbiome on Ocular Health. *Ocul Surf* 14:342–349. doi: 10.1016/j.jtos.2016.04.004
- Lass JH, Gordon JF, Sugar A, et al (1993) Optisol containing streptomycin. *Am. J. Ophthalmol* 116:503-4.

- Lee SH, Oh DH, Jung JY, et al (2012) Comparative Ocular Microbial Communities in Humans with and without Blepharitis. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 53:5585. doi: 10.1167/iovs.12-9922
- Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD (1983) Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. *Ophthalmology* 90:38–39. doi: 10.1016/S0161-6420(83)34601-7
- McDermott AM (2013) Antimicrobial compounds in tears. *Exp. Eye Res.*
- Miller D, Iovieno A (2009) The role of microbial flora on the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9:466–470. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283303e1b
- Nieder Korn JY (2011) Cornea: Window to Ocular Immunology. *Curr Immunol Rev* 7:328–335. doi: 10.2174/157339511796196593
- Ozkan J, Willcox M, Wemheuer B, et al (2019) Biogeography of the human ocular microbiota. *Ocul Surf* 17:111–118. doi: 10.1016/j.jtos.2018.11.005
- Pascolini D, Mariotti SP (2012) Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 96:614–618. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539
- Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, et al (2005) The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: A review of the source and management of corneal tissue. *Cornea* 24:576–82.
- Pels E, Vrensen GFJM (1999) Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity, and effectiveness. *Br J Ophthalmol* 83:1019–1026. doi: 10.1136/bjo.83.9.1019
- Pereira MLM, Santos AMC, Passos MC PJ (2002) Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. *Rev Brasileira Oftalmol* 61:169–172
- Campos MSQ, Campos DQ, Silva L, et al (2009) Anaerobic flora of the conjunctival sac in patients with AIDS and with anophthalmia compared with normal eyes. *Acta Ophthalmol* 72:241–245. doi: 10.1111/j.1755-3768.1994.tb05023.x
- Robert PY, Camezind P, Drouet M, et al (2002) Internal and external contamination of donor corneas before in situ excision: Bacterial risk factors in 93 donors. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 240:265–70 doi: 10.1007/s004170100322
- Santos CG dos, Pacini KM, Adán CBD, Sato EH (2010) Motivos do descarte de córneas captadas pelo banco de olhos do Hospital São Paulo em dois anos. *Rev Bras Oftalmol* 69:18–22. doi: 10.1590/S0034-72802010000100004
- Seedor JA, Stulting RD, Epstein RJ, et al (1987) Survival of Corneal Grafts from Donors Supported by Mechanical Ventilation. *Ophthalmology* 94:101–8. doi: 10.1016/S0161-

6420(87)33490-6

- Speaker MG, Milch FA, Shah MK, et al (1991) Role of External Bacterial Flora in the Pathogenesis of Acute Postoperative Endophthalmitis. *Ophthalmology* 98:639–49. doi: 10.1016/S0161-6420(91)32239-5
- Spelsberg H, Reinhard T, Sengler U, et al (2002) Organ-cultured corneal grafts from septic donors: a retrospective study. *Eye* 16:622–627. doi: 10.1038/sj.eye.6700145
- Ta CN, Chang RT, Singh K, et al (2003) Antibiotic resistance patterns of ocular bacterial flora. *Ophthalmology* 110:1946–1951. doi: 10.1016/S0161-6420(03)00735-8
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, et al (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671–7. doi: 10.1038/nature01014
- Tsui E, Fogel E, Hansen K, et al (2016) Candida Interface Infections After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 35:456–464. doi: 10.1097/ICO.0000000000000778
- Villarrubia A, Cano-Ortiz A (2014) Candida Keratitis after Descemet Stripping with Automated Endothelial Keratoplasty. *Eur J Ophthalmol* 24:964–967. doi: 10.5301/ejo.5000499
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP (2001) Corneal blindness: A global perspective. *Bull World Health Organ* 79:214–21. doi: 10.1111/ceo.12330
- Willcox MDP (2013) Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res* 117:99–105. doi: 10.1016/j.exer.2013.06.003.
- Zegans ME, Van Gelder RN (2014) Considerations in Understanding the Ocular Surface Microbiome. *Am J Ophthalmol* 158:420–422. doi: 10.1016/j.ajo.2014.06.014
- Zhang H, Zhao F, Hutchinson DS, et al (2017) Conjunctival Microbiome Changes Associated With Soft Contact Lens and Orthokeratology Lens Wearing. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 58:128–136. doi: 10.1167/iovs.16-20231
- Zhou Y, Holland MJ, Makalo P, et al (2014) The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: A case control study. *Genome Med* 6:99 doi: 10.1186/s13073-014-0099-x

3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os estudos baseados em técnicas independentes de cultivo, mostraram haver uma diversidade muito maior de bactérias que colonizam o globo ocular, do que se pensava existir. Assim como mostraram que as bactérias presentes em maior frequência são do gênero *Pseudomonas* e não SNC, como nos resultados de estudos baseados em crescimento em meios de cultivo. A metagenômica, ampliou muito a gama de informações sobre a microbiota do corpo humano, porém, por se acreditar que havia uma baixa diversidade de espécies microbianas no bioma ocular, esse estudo acabou ficando de lado. O que tem mudado nos últimos anos, trazendo novas informações importantes. Os antibióticos presentes nos meios de cultivo utilizados no Brasil, gentamicina e estreptomicina, já se mostram controversos, a medida em que muitas espécies bacterianas isoladas dos meios de preservação e de infecções pós transplante, são resistentes a gentamicina e algumas, resistentes a gentamicina e estreptomicina. A necessidade de se rever os antimicrobianos utilizados nos meios de preservação, seja por sua eficiência ou pelo grupo alvo a ser atingido, já que estudos indicaram a presença de uma grande quantidade de bactérias Gram-negativas no bioma ocular, pode levar ao desenvolvimento de um protocolo unificado para utilização no Brasil. A ausência de informações sobre o acompanhamento de pacientes transplantados e, principalmente, sobre o sucesso dos procedimentos ou dos casos de infecções pós transplante, dificulta a análise de dados. O aumento da investigação das infecções pós transplante, contribuiria para a elaboração de protocolos otimizados com fins de diminuir descarte de tecidos e aumentar a eficiência na descontaminação, assim como a eficiência dos transplantes.

REFERÊNCIAS

- Al-Assiri A, Al-Jastaneiah S, Al-Khalaf A, Al-Fraikh H, Wagoner MD. Late-onset donor-to-host transmission of *Candida glabrata* following corneal transplantation. *Cornea* [Internet]. 2006 Jan;25(1):123–5. Available from: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=16331055>
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* [Internet]. 1995 Mar;59(1):143–69. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239358/>
- Antonios SR, Cameron JA, Badr IA, Habash NR, Cotter JB. Contamination of Donor Cornea: Postpenetrating Keratoplasty Endophthalmitis. *Cornea* [Internet]. 1991 May;10(3):217–20. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-199105000-00006>
- Anvisa. Resolução N° 67, de 30 de setembro de 2008 [Internet]. Brasil; 2008. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0067_30_09_2008.html
- Araújo MEX dos S, Scarpi MJ. Microbiota bacteriana da conjuntiva de doadores de córnea. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2004 Dec;67(6):927–33. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492004000600016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
- Armitage, WJ, Easty DL. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* January [Internet]. 1997;38:16–24. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161333>
- Armitage WJ. Preservation of human cornea. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. [Internet] 2011;38:143–147. Available from: <https://doi.org/10.1159/000326632>
- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Dimensionamento de Transplantes no Brasil e em cada Estado (2010-2017). *Regist Bras Transplantes* [Internet]. 2017;23(4). Available from: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>
- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. (2011-2018). *Regist Bras Transplantes* [Internet]. 2018;24(4). Available from: http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/Lv_RBT-2018.pdf
- Baer JC, Nirankari VS, Glaros DS. Streptococcal Endophthalmitis From Contaminated Donor Corneas After Keratoplasty. *Arch Ophthalmol* [Internet] 1988 106(04):517-520

- <http://10.1001/archophth.1988.01060130563037>
- Berry M, Harris A, Lumb R, Powell K. Commensal ocular bacteria degrade mucins. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2002 Dec; 86(12): 1412–1416. Available from: [http:// doi: 10.1136/bjo.86.12.1412](http://doi:10.1136/bjo.86.12.1412)
- Boost M, Cho P, Wang Z. Disturbing the balance: effect of contact lens use on the ocular proteome and microbiome. *Clin Exp Optom* [Internet]. 2017 Sep;100(5):459–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cxo.12582>
- Borderie VM, Laroche L. MICROBIOLOGIC STUDY OF ORGAN-CULTURED DONOR CORNEAS. *Transplantation* [Internet]. 1998 Jul;66(1):120–3. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007890-199807150-00020>
- Borowsky CM, Wallau AD, Reetz A, Kwitko S, Rymer S, Locatelli CI. Contaminação de halos doadores córneo-esclerais em ceratoplastia penetrante no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2008 Feb;71(1):13–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492008000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
- Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli M V, Das A, Jonas JB, et al. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2017 Sep;5(9):e888-e897. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214-109X\(17\)30293-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214-109X(17)30293-0)
- Broniek G, Langwińska-Wośko E, Sybilska M, Szaflik J, Szaflik JP, Wróblewska M. Prevalence of bacteria and fungi in samples of cornea preservation fluid. *Arch Med Sci* [Internet]. 2018 14(3):541–6. Available from: <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58927>
- Brown MM, Brown GC, Lieske HB, Lieske PA. Financial return-on-investment of ophthalmic interventions: A new paradigm. *Current Opinion in Ophthalmology* [Internet]. 2014 May;25(3):171-6 Available from: <https://insights.ovid.com/article/00055735-201405000-00005>
- Bruinsma M, Lie JT, Groeneveld-van Beek EA, Liarakos VS, van der Wees J, Melles GRJ. Are Polymegethism, Pleomorphism, and “Poor Swelling” Valid Discard Parameters in Immediate Postmortem Evaluation of Human Donor Corneal Endothelium? *Cornea* [Internet]. 2013 Mar;32(3):285–9. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-201303000-00011>
- Ciulla TA, Starr MB, Masket S. Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery:

- An evidence-based update. *Ophthalmology* [Internet]. 2002 Jan;109(1):13-24. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161-6420\(01\)00899-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161-6420(01)00899-5)
- Cruz GKP, Azevedo IC de, Carvalho DP de SRP, Vitor AF, Santos VEP, Ferreira Júnior MA. Clinical and epidemiological aspects of cornea transplant patients of a reference hospital. *Rev Lat Am Enfermagem* [Internet]. 2017 Jun;25:e2897. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692017000100350&lng=en&tlng=en
- Doan T, Akileswaran L, Andersen D, Johnson B, Ko N, Shrestha A, et al. Paucibacterial microbiome and resident DNA virome of the healthy conjunctiva. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2016 Oct;57(13):5116-5126. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5054734/>
- Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2011 Jul;52(8):5408. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.10-6939>
- Durand ML. Endophthalmitis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2013 Mar;19(3):227–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14601282>
- Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2006;7(3):147–66. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10561-006-0003-z>
- Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, Macsai MS, Wang C-H. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported From 2007 to 2014. *Cornea* [Internet]. 2016 Jul;35(7):917–26. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-201607000-00001>
- Eguchi H, Hotta F, Kuwahara T, Imaohji H, Miyazaki C, Hirose M, et al. Diagnostic Approach to Ocular Infections Using Various Techniques From Conventional Culture to Next-Generation Sequencing Analysis. *Cornea* [Internet]. 2017 Nov;36:S46–52. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-201711001-00010>
- Elander TR, Goldberg MA, Salinger CL, Tan JR, Levy B, Abbott RL. Microbial changes in the ocular environment with contact lens wear. *CLAO J* [Internet]. 1992 Jan;18(1):53–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1559290>
- Engelmann K, Ventura AS, Drexler D, Staude HJ. A sensitive method for testing the quality of organ culture media and of individual medium components in a cornea bank. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 1998 Apr;236(4):312-9. Available from:

- <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004170050084>
- Farrell PL, Fan JT, Smith RE, Trousdale MD. Donor cornea bacterial contamination. *Cornea* [Internet]. 1991 Sep;10(5):381-6. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-199109000-00004>
- Fong LP, Gladstone D, Casey TA. Corneo-scleral rim cultures: Donor contamination a case of fungal endophthalmitis transmitted by K-Sol stored cornea. *Eye* [Internet]. 1988 Nov;2(6):670–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/eye1988123>
- Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Altieri ACF. A novel culturing system for fluid samples. *Med Sci Monit* [Internet]. 2009;15(2):BR55–60. Available from: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/869553>
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules* [Internet]. 2015 May 18;20(5):8856–74. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/5/8856>
- Freitas RA de, Dell’Agnolo CM, Augusto de Melo W, de Andrade L, Pimentel RR, Pelloso SM, et al. Do Donated Corneas Become Transplanted Corneas? The Causes of Discard in Southern Brazil. *Cornea* [Internet]. 2019 Apr;38(4):419–25. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-900000000-96621>
- Frueh BE, Böhnke M. Prospective, randomized clinical evaluation of optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol* [Internet]. 2000 Jun;118(6):757-60. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/413248>
- Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* [Internet]. 2016 Feb 1;134(2):167. Available from: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
- Gandhi SS, Lamberts DW, Perry HD. Donor to host transmission of disease via corneal transplantation. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 1981 Mar;25(5):306–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0039625781901569>
- Garg S, Said B, Farid M, Steinert RF. Prevalence of Positive Microbiology Results From Donor Cornea Tissue in Different Methods of Corneal Transplantation. *Cornea* [Internet]. 2013 Feb;32(2):137–40. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-201302000-00005>
- Gomes JAP, Dana M-R, Dua HS, Goren MB, Laibson PR, Cohen EJ. Positive Donor Rim Culture in Penetrating Keratoplasty. *Cornea* [Internet]. 1995 Sep;14(5):457–62.

- Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-199509000-00003>
- Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JSG, et al. Ocular pathogen or commensal: A PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2007 Dec;48(12):5616-23. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2125573>
- Gray ND, Miskin IP, Kornilova O, Curtis TP, Head IM. Occurrence and activity of archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environ Microbiol* [Internet]. 2002;4(3):158–68. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-2920.2002.00280.x>
- Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW, et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* [Internet]. 2008 Jul 1;18(7):1043–50. Available from: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.075549.107>
- Gruenert AK, Rosenbaum K, Geerling G, Fuchsluger TA. The influence of donor factors on corneal organ culture contamination. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2017 Nov;95(7):733–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aos.13402>
- Grzybowski A, Brona P, Kim SJ. Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 2017 May 22;255(5):851–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00417-017-3608-y>
- Hassan SS, Wilhelmus KR. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2005 Apr;139(4):685-90. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9394\(04\)01497-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9394(04)01497-7)
- Hsu HY, Lind JT, Tseng L, Miller D. Ocular flora and their antibiotic resistance patterns in the midwest: A prospective study of patients undergoing cataract surgery. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2013 Jan;155(1):36-44.e2. Available from: [https://www.ajo.com/article/S0002-9394\(12\)00479-5/fulltext](https://www.ajo.com/article/S0002-9394(12)00479-5/fulltext)
- Huang Y, Yang B, Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2016 Jul;22(7):643.e7-643.e12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X16300659>
- Jeng BH. Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol* [Internet]. 2006 Aug;17(4):332–7. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00055735-200608000-00003>
- Kanavi MR, Javadi MA, Chamani T, Fahim P, Javadi F. Comparing quantitative and qualitative indices of the donated corneas maintained in Optisol-GS with those kept in

- Eusol-C. Cell Tissue Bank [Internet]. 2015 Jun 7;16(2):243–7. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10561-014-9466-5>
- Khokhar DS, Sethi HS, Kumar H, Sudan R, Sharma N, Nayak N. Postkeratoplasty Endophthalmitis by *Alcaligenes faecalis*. Cornea [Internet]. 2002 Mar;21(2):232–3. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-200203000-00024>
- Khouani M, Debellemannièrè G, Malugani C, Gauthier AS, Pouthier F, Delbosc B, et al. Evaluation of Microbial Contamination of Corneal Transplants. Cornea [Internet]. 2014 Sep;33(9):899–904. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-201409000-00005>
- Kloess PM, Stulting RD, Waring GO, Wilson LA. Bacterial and Fungal Endophthalmitis After Penetrating Keratoplasty. Am J Ophthalmol [Internet]. 1993 Mar;115(3):309–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939414735809>
- Koenig SB, Wirostko WJ, Fish RI, Covert DJ. Candida Keratitis After Descemet Stripping and Automated Endothelial Keratoplasty. Cornea [Internet]. 2009 May;28(4):471–3. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-200905000-00021>
- Kugadas A, Gadjeva M. Impact of Microbiome on Ocular Health. Ocul Surf [Internet]. 2016;14(3):342–9. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5082109/>
- Lass JH, Gordon JF, Sugar A, Norden RA, Reinhart WJ, Meyer RF, et al. Optisol containing streptomycin. Amer Jour Oftal [Internet] 1993. Oct;116(4):503-4 Available from:
[https://www.ajo.com/article/S0002-9394\(14\)71413-8/pdf](https://www.ajo.com/article/S0002-9394(14)71413-8/pdf)
- Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and Safety of Antifungal Additives in Optisol-GS Corneal Storage Medium. JAMA Ophthalmol [Internet]. 2014 Jul;132(7):832. Available from:
<http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaophthalmol.2014.397>
- Lee SH, Oh DH, Jung JY, Kim JC, Jeon CO. Comparative Ocular Microbial Communities in Humans with and without Blepharitis. Investig Ophthalmology Vis Sci [Internet]. 2012 Aug 15;53(9):5585. Available from:
<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.12-9922>
- Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD. Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. Ophthalmology [Internet]. 1983 Jan;90(1):38–9. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642083346017>
- McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res* [Internet]. 2013 Dec;117:53-61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.014>
- Miller D, Iovieno A. The role of microbial flora on the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2009 Oct;9(5):466–70. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00130832-200910000-00012>
- Ozkan J, Willcox M, Wemheuer B, Wilcsek G, Coroneo M, Thomas T. Biogeography of the human ocular microbiota. *Ocul Surf* [Internet]. 2019 Jan;17(1):111–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012418302295>
- Panda A, Saxena R, Vajpayee RB, Satpathy G, Angra SK, Sethi HS. The Efficacy of Postenucleation Saline Wash and the Effect of Different Antimicrobial Agents on Microbial Contamination of Donor Eyes. *Ophthalmic Res* [Internet]. 2006;38(5):287–93. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/95772>
- Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2012 May;96(5):614–8. Available from: <http://bjo.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjophthalmol-2011-300539>
- Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, Sherwin T, Ormonde S, Clover GM, et al. The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: A review of the source and management of corneal tissue. *Cornea* [Internet]. 2005 Jul;24(5):576-82. Available from: https://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/2005/07000/The_New_Zealand_National_Eye_Bank_Study_1991_2003_.11.aspx
- Pels E, Vrensen GFJM. Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity, and effectiveness. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1999 Sep 1;83(9):1019–26. Available from: <http://bjo.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjo.83.9.1019>
- Pereira MLM, Santos AMC, Passos MC PJ. Análise comparativa entre os bancos de olhos brasileiros: da preservação à distribuição da córnea doada. *Rev Brasileira Oftalmol*. 2002;61(3):169–72.
- Campos MSQ, Campos DQ, e Silva L, Rehder JRCL, Lee MB, O'Brien T, McDonnell PJ. Anaerobic flora of the conjunctival sac in patients with AIDS and with anophthalmia compared with normal eyes. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2009 May 27;72(2):241–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-3768.1994.tb05023.x>
- Robert PY, Camezind P, Drouet M, Ploy MC, Adenis JP. Internal and external contamination of donor corneas before in situ excision: Bacterial risk factors in 93 donors. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 2002 Apr;240(4):265-70 Available from:

- <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004170100322>
- Saldanha BO, Oliveira RE, Araújo PLP, Pereira WA, Simão Filho C. Causes of Nonuse of Corneas Donated in 2007 in Minas Gerais. *Transplant Proc* [Internet]. 2009 Apr;41(3):802–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134509001171>
- Santos CG dos, Pacini KM, Adán CBD, Sato EH. Motivos do descarte de córneas captadas pelo banco de olhos do Hospital São Paulo em dois anos. *Rev Bras Oftalmol* [Internet]. 2010 Feb;69(1):18–22. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72802010000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
- Seedor JA, Stulting RD, Epstein RJ, Nay RE, Dreizen NG, Waking GO, et al. Survival of Corneal Grafts from Donors Supported by Mechanical Ventilation. *Ophthalmology* [Internet]. 1987 Feb;94(2):101-8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(87\)33490-6](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(87)33490-6)
- Shalchi Z, Gurbaxani A, Baker M, Nash J. Antibiotic Resistance in Microbial Keratitis: Ten-Year Experience of Corneal Scrapes in the United Kingdom. *Ophthalmology* [Internet]. 2011 Nov;118(11):2161–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642011004088>
- Sharma P, Sharma N, Mishra P, Joseph J, Mishra DK, Garg P, et al. Differential Expression of Antimicrobial Peptides in Streptococcus pneumoniae Keratitis and STAT3-Dependent Expression of LL-37 by Streptococcus pneumoniae in Human Corneal Epithelial Cells. *Pathogens* [Internet]. 2019 Mar 6;8(1):31. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/1/31>
- Sousa SJ de F e, Sousa SB de F e. Eye bank procedures: donor selection criteria. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2018;81(1):73–9. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0004-2749.20180017>
- Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN. Role of External Bacterial Flora in the Pathogenesis of Acute Postoperative Endophthalmitis. *Ophthalmology* [Internet]. 1991 May;98(5):639-49. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(91\)32239-5](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(91)32239-5)
- Spelsberg H, Reinhard T, Sengler U, Daeubener W, Sundmacher R. Organ-cultured corneal grafts from septic donors: a retrospective study. *Eye* [Internet]. 2002 Sep 27;16(5):622–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/6700145>
- Ta CN, Chang RT, Singh K, Egbert PR, Shriver EM, Blumenkranz MS, et al. Antibiotic

- resistance patterns of ocular bacterial flora. *Ophthalmology* [Internet]. 2003 Oct;110(10):1946–51. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642003007358>
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* [Internet]. 2002;418(6898):671–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01014>
- Tran D, Dhaliwal D, Kamyar R, Jhanji V, Kowalski RP. Effect of Optisol Supplementation With 0.255 µg/mL Amphotericin B on Elimination of Yeast at 5°C. *Cornea* [Internet]. 2019 Apr;16:1–4. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-900000000-96542>
- Tsui E, Fogel E, Hansen K, Talbot EA, Tammer R, Fogel J, et al. Candida Interface Infections After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea* [Internet]. 2016 Apr;35(4):456–64. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-6-201604000-00006>
- Villarrubia A, Cano-Ortiz A. Candida Keratitis after Descemet Stripping with Automated Endothelial Keratoplasty. *Eur J Ophthalmol* [Internet]. 2014 Nov 25;24(6):964–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5301/ejo.5000499>
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: A global perspective. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2001;79(3):214-21 Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566379/>
- Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res* [Internet]. 2013 Dec;117:99-105. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.003>
- Niederhorn JY. Cornea: Window to Ocular Immunology. *Curr Immunol Rev* [Internet]. 2011 Aug 1;7(3):328–35. Available from:
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&iissn=1573-3955&volume=7&issue=3&spage=328>
- Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Ampiero DC, Frigo AC, Ponzin D. Bacterial Contamination of Human Organ-Cultured Corneas. *Cornea* [Internet]. 2005 Jul;24(5):603–7. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003226-200507000-00016>
- Zegans ME, Van Gelder RN. Considerations in Understanding the Ocular Surface Microbiome. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2014 Sep;158(3):420–2. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939414003614>

- Zhang H, Zhao F, Hutchinson DS, Sun W, Ajami NJ, Lai S, et al. Conjunctival Microbiome Changes Associated With Soft Contact Lens and Orthokeratology Lens Wearing. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2017 Jan 9;58(1):128. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.16-20231>
- Zhou Y, Holland MJ, Makalo P, Joof H, Roberts C h., Mabey DCW, et al. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: A case control study. *Genome Med* [Internet]. 2014 Nov;15;6(11):99. Available from: [Internet].

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL AND TISSUE BANKING

Instructions for authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

ADDITIONAL REQUEST TITLE PAGE

Besides the affiliation(s) and address(es) of the author(s), please also mention the Institutional email address of all authors.

TEXT

Text Formatting Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, 19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&detailsPage=pltc_i_1060169 3/14 and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L(2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California 19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access
https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&details
 Page=pltc_1060169 4/14

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title

Word Abbreviations, see ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading. 19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&details Page=pltc_1060169 5/14

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another 19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&details Page=pltc_1060169 6/14 when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors

are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm. Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used. Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Accessibility

19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access

https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&detailsPage=pltdi_1060169 7/14. In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author

names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

19/05/2019 Cell and Tissue Banking - incl. option to publish open access
https://www.springer.com/life+sciences/cell+biology/journal/10561?print_view=true&details
Page=pltci_1060169 8/14

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the

animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.